动 物 学 研 究 2004, Feb. 25 (1): 32 ~ 36 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

四种渗透性防冻剂在猕猴精子低温冷冻保存中对精子功能状态的影响

司 维[1,2], 李亚辉[1,3], 关 沫[1], 季维智[1,*]
(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;
3. 云南农业大学 食品与技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 以冷冻精子的复苏运动度、荧光染料 Hoechst 33258 检测的细胞膜完整率、异硫氰酸荧光素标记的花生凝集素 (FITC-PNA) 检测的顶体完整率作为精子功能状态的指标, 对甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇 4 种常用渗透性防冻剂在猕猴精子冷冻保存过程中的作用进行了比较。结果表明: 冷冻保存精子的复苏运动度, 甘油 (47.3 ± 5.7%) 和乙二醇 (44.8 ± 6.7%) > 二甲亚砜 (22.9 ± 0.9%) > 丙二醇 (0 ± 0%); 细胞膜完整率, 甘油 (54.8 ± 3.2%) 和乙二醇 (54.0 ± 6.7%) > 二甲亚砜 (37.5 ± 7.0%) > 丙二醇 (28.3 ± 6.5%); 顶体完整率, 甘油 (82.2 ± 2.4%) 和乙二醇 (82.4 ± 2.4%) > 二甲亚砜 (68.7 ± 5.7%) 和丙二醇 (72.3 ± 3.5%) ($P < 0.05$)。结果提示: 二甲亚砜和丙二醇, 尤其是丙二醇并不适合猕猴精子的冷冻保存; 而乙二醇具有和甘油相似的保护作用, 是一种极具潜力的猕猴精子冷冻保存的渗透性防冻剂。

关键词: 渗透性防冻剂; 猕猴; 冷冻; 精子
中图分类号: Q959.848; Q492 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254 - 5853(2004)01 - 0032 - 05

Cryoprotective Effect of Four Penetrating Cryoprotectants on Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Spermatozoa Cryopreservation

SI Wei[1,2], LI Ya-hui[1,3], GUAN Mo[1], JI Wei-zhi[1,*]
(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan* 650223, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*;
3. *College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan* 650201, *China*)

Abstract: The present study aimed to examine four cryoprotectants: glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol on rhesus monkey sperm cryopreservation. Frozen-thawed sperm cryo-survival and function was evaluated by sperm motility, plasma membrane integrity and acrosome integrity, and sperm plasma membrane and acrosome status was determined by nuclei stain Hoechst 33258 and Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA). The result showed that: for the ability of protection on post-thaw sperm motility, glycerol (47.3 ± 5.7%) and ethylene glycol (44.8 ± 6.7%) > dimethyl sulfoxide (22.9 ± 0.9%) > ethylene glycol (0 ± 0%); for the ability of protection on sperm plasma membrane integrity, glycerol (54.8 ± 3.2%) and ethylene glycol (54.0 ± 6.7%) > dimethyl sulfoxide (37.5 ± 7.0%) > ethylene glycol (28.3 ± 6.5%); for the ability of protection on sperm acrosome integrity, glycerol (82.2 ± 2.4%) and ethylene glycol (82.4 ± 2.4%) > dimethyl sulfoxide (68.7 ± 5.7%) and ethylene glycol (72.3 ± 3.5%) ($P < 0.05$). The results indicate that cryoprotective effects of various penetrating cryoprotectants are different. Dimethyl sulfoxide and propylene glycol are not suitable for rhesus monkey sperm freezing, especially propylene glycol. Ethylene glycol with similar cryoprotective properties to glycerol could be successfully used in the cryopreservation of rhesus monkey spermatozoa.

收稿日期: 2003 - 08 - 19; 接受日期: 2003 - 11 - 03
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970117); 科技部科技基础工作专项资金项目 (2001 DEA 10009 - 09); 基础性研究重大项目计划 (973) (TG2000016108)
* 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0871 - 5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

Key words: Pnetrating cryoprotectant; Resus monkey; Cryopreservation; Spermatozoa

自从1949年Polge et al用甘油作为防冻剂冷冻成功保存精子以来，精子低温冷冻保存的研究在家畜、一些野生动物和人类都取得了很大发展，并逐渐成为生物多样性、遗传资源迁地保护的一个重要手段。迄今为止，甘油仍是精子冷冻保存使用最广泛的渗透性防冻剂（Curry，2000）。近年来，其他类型的渗透性防冻剂，例如二甲亚砜也成功地应用于小鼠和兔子精子的冷冻保存（Sztein et al，2001；Vicente & Viudes-de-Castro，1996）；乙二醇成功地应用于马精子的冷冻保存（Mantovani et al，2002）。然而，由于对精子冷冻保存机制理解甚少，冷冻和复苏后，仅大约50%的精子能够存活下来。

灵长类动物由于其特殊的进化地位，是医学生物学研究常用的实验动物，也是生物多样性保护的重点，开展其种质资源冷冻保存的研究具有重要的意义。应用低温生物技术冷冻保存灵长类动物的精子已有30余年的历史，但成功率很低。除了因为灵长类动物的精子较为脆弱之外（Gould & Styperek，1989），缺乏精子的低温生物学参数的研究也是导致冷冻保存效率低下的一个重要原因。防冻剂是精子冷冻保存的关键因素之一，开发高效、低毒的防冻剂也是精子冷冻保存研究的一个重要方向。甘油是灵长类动物精子冷冻使用最广泛的渗透性防冻剂（Morrell & Hodges，1998）。已有研究用5%的甘油作为渗透性防冻剂冷冻保存猕猴精子并成功地进行了体外受精（Si et al，2000）和人工授精（Gabriel et al，2000）。与甘油相比，其他类型的渗透性防冻剂对灵长类动物精子冷冻保护效率有所不同：二甲亚砜（Sadleir，1966；Gould & Styperek，1989）和丙二醇（Feradis et al，2001）的冷冻保护效率都低于甘油。然而，迄今为止，未见用乙二醇作为渗透性防冻剂冷冻保存灵长类动物（包括猕猴）精子的研究报道。因此，本研究以猕猴为研究对象，以冷冻复苏精子的运动度、细胞膜完整率和顶体完整率作为精子功能状态的检测指标，探讨甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇4种常用渗透性防冻剂在精子冷冻和复苏过程中的保护作用。

1 材料与方法

1.1 防冻液的配制

精子冷冻稀释液（sperm-diluting medium）的成分见表1。将所有称量好的成分和新鲜卵黄溶于Milli-Q水中混匀后，于7 000 *g* 离心1 h去除卵黄颗粒。用NaOH或HCl调节上清液pH至7.2，分装并储存于-30 ℃待用。精子冷冻稀释液的储存时间不超过两周。使用前在37 ℃水浴中解冻，分别加入10%（v/v）的甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇，配制成防冻液（sperm-freezing medium）。所有化学药品均来自于Sigma公司。

表1　精子冷冻稀释液的组成
Table 1　Composition of sperm-diluting medium

成分 Component	浓度 Concentration
葡萄糖 Glucose	0.15 mol/L
乳糖 Lactose	0.15 mol/L
青霉素 Penecillin-G	100 000 IU/L
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	0.05 g/L
卵黄 Egg yolk	100 mL/L

1.2 精液的采集

4只雄性健康猕猴来自于中国科学院昆明动物研究所实验动物中心。肌肉注射盐酸氯胺酮（4 mg/kg体重）麻醉，用美国Grass公司产S44型方波发生器，通过阴茎电刺激采集精液（Yang et al，1994）。精液在37 ℃液化30 min后，用TALP-Hepes（Bavister et al，1983）在150 *g* 离心10 min洗去精浆。检测新鲜精子的浓度、运动度、细胞膜完整率和顶体完整率。

1.3 精子冷冻保存与冷冻精子复苏

精子冷冻过程参照Si et al（2000）的报道。本研究共用精液10份，每份精液又分为4等份，在室温下，洗过的精子首先用冷冻稀释液（不含渗透性防冻剂）按1∶9的体积比稀释。将稀释精子于4 ℃平衡2 h后，然后再分5次分别逐滴加入等体积、预冷至4 ℃、含10%（v/v）甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇的4种防冻液。每次间隔6 min，使4份稀释液中渗透性防冻剂的终浓度都为5%。继续在4 ℃平衡30 min，并将稀释好的精子分装入0.25 mL冷冻麦管中封口。将冷冻麦管水平地置于液氮面上方5 cm处冷冻10 min，然后直接投入液氮中冻存。冻存至少1 d后，将麦管直接投入37 ℃水浴中2 min，并加以搅动使精子解冻复苏。

1.4 复苏运动度检测

取 10 μL 用 TALP-Hepes 稀释的精子，加到预热至 37 ℃的 Makler 板上，记录运动精子占精子总数的百分率。每次至少计数 200 个精子。

1.5 精子细胞膜完整率和顶体完整率检测

鲜精和冷冻复苏精子细胞膜完整率和精子顶体完整率的检测采用荧光染料 Hoechst 33258 和 FITC 标记的花生凝集素（FITC-PNA）染色。染色步骤参照 Cross et al（1986）、Esteves et al（1998）的方法进行：鲜精或冷冻复苏精子与 2 mg/mL 的 Hoechst 33258（DPBS 溶液配制）避光孵育 5 min 后，在 150 *g* 离心 5 min，洗去多余染料。沉淀的精子颗粒用 DPBS 溶液稀释并涂片。待涂片风干后，立即用无水甲醇在 4 ℃固定 30 s。将涂片置于湿盒中，与 40 mg/mL 的 FITC-PNA（DPBS 溶液配制）避光孵育 20 min 后，用 DPBS 溶液洗去多余的染料。风干后将涂片置于荧光显微镜下检查。Hoechst 33258 的激发光为紫外光，发射光波长 420 nm。细胞膜破损的精子头部被染成均匀的亮蓝色，而细胞膜完整的精子头部不被染色。FITC-PNA 的激发光波长 490 nm，发射光波长 515 nm。顶体完整的精子头部被染成均匀的苹果绿色，而发生了顶体反应的精子头部则仅部分着色或不被染色。分别记录细胞膜完整精子和顶体完整精子占精子总数的百分率。每次至少记录 200 个精子。

1.6 统计分析

数据经过平方根的反正弦转换，用最小显著差数法（least significant difference test）检验数据间的差异显著性。

2 结 果

2.1 4 种渗透性防冻剂对精子复苏运动度的影响

甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇冻存精子后的复苏运动度见表 2。用甘油和乙二醇冻存精子的复苏运动度最高，但二者之间差异不显著（$P > 0.05$），二甲亚砜的效果次之，而用丙二醇冻存的精子复苏后全部失去了运动能力。

2.2 4 种渗透性防冻剂对精子细胞膜的影响

甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇冻存精子的细胞膜完整率见图 1。与新鲜精子细胞膜（78.6 ± 4.4%）相比，经 4 种防冻剂冻存的精子复苏后细胞膜完整率均显著降低（$P < 0.05$）。但在 4 种防冻剂中甘油和乙二醇冻存的精子复苏后细胞膜完整率较高，而且二者没有显著差异（54.8 ± 3.2% 和 54.0 ± 6.7%，$P > 0.05$）二甲亚砜次之（37.5 ± 7.0%，$P < 0.05$），丙二醇最差（28.3 ± 6.5%，$P < 0.05$）。

2.3 4 种渗透性防冻剂对精子顶体的影响

甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇冻存精子的顶体完整率见图 1。与新鲜精子（90.6 ± 2.1%）相比，经 4 种渗透性防冻剂冻存的精子复苏后顶体完整率都有所降低（$P < 0.05$）。但乙二醇和甘油的冻存精子的顶体完整率接近（82.2 ± 2.4% 和 82.4 ± 2.4%，$P > 0.05$），明显高于二甲亚砜和丙二醇（$P < 0.05$）。二甲亚砜和丙二醇之间差异不显著（68.7 ± 5.7% 和 72.3 ± 3.5%，$P > 0.05$）。

3 讨 论

本文结果表明丙二醇、二甲亚砜对猕猴精子的冷冻保护作用显著低于甘油和乙二醇，尤其是丙二醇对猕猴精子运动能力和细胞膜的冷冻保护作用最差。而乙二醇和甘油具有相近的冷冻保护效果，因此，乙二醇是一种可以替代甘油应用于猕猴精子冷冻保存的渗透性防冻剂。

表 2 甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇冷冻精子的复苏运动度

Table 2 Post-thaw motility of sperm cryopreserved by glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol

防冻剂 Cryoprotectant	冷冻前的精子运动度 Pre-freeze motility（%）	冷冻精子的复苏运动度 Post-thaw motility（%）
甘油 Glycerol	74.1 ± 4.7^a	47.3 ± 5.7^b
乙二醇 Ethylene glycol	74.1 ± 4.7^a	44.8 ± 6.7^b
二甲亚砜 Dimethyl sulphoxide	74.1 ± 4.7^a	22.9 ± 0.9^c
丙二醇 Propylene glycol	74.1 ± 4.7^a	0 ± 0^d

$n = 10$。上标字母不同表示差异显著（最小显著差数法，$P < 0.05$）。

$n = 10$. Different superscripts indicate significant difference (least significant difference test, $P < 0.05$).

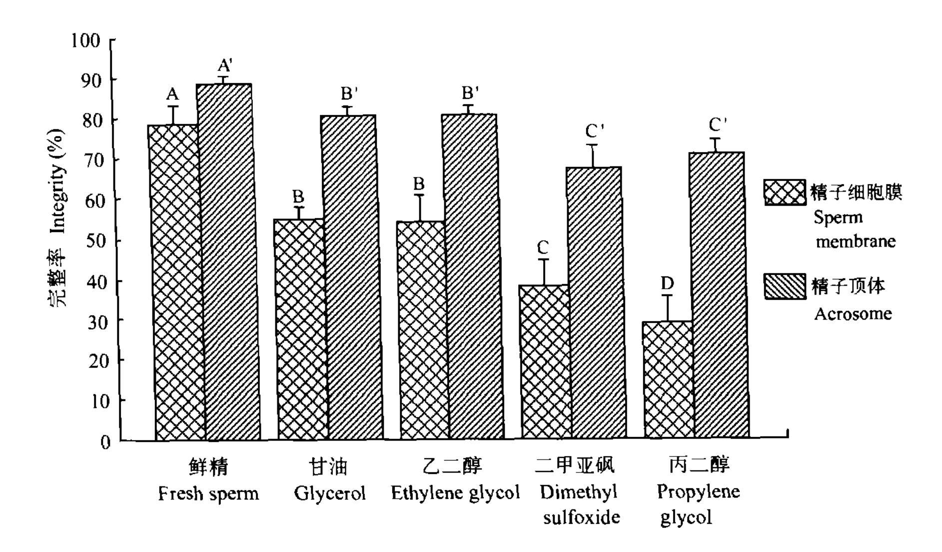


图 1　甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇冷冻精子的细胞膜完整率和顶体完整率

Fig.1　Membrane integrity and acrosome integrity of sperm cryopresered by glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol

$n = 10$。柱上不同字母表示差异显著（最小显著差数法，$P < 0.05$）。

$n = 10$. Different letters above the bar indicate significant difference between columns (least significant difference test, $P < 0.05$).

Sadleir（1966）在冷冻保存电刺激采集的黑猩猩精子时发现二甲亚砜的冷冻保护作用低于甘油；同样，Gould & Styperek（1989）用二甲亚砜冻存黑猩猩的精子不能像用甘油冻存的精子那样使卵母细胞体外受精。而 Feradis et al（2001）的研究结果却显示，用甘油和二甲亚砜冷冻保存取自于食蟹猴附睾的精子，二者的复苏运动度无显著差异；丙二醇的冷冻效果则明显低于甘油和二甲亚砜。尽管猕猴与食蟹猴的亲缘关系非常接近，但是我们的结果与在食蟹猴上取得的结果有所不相同，反而与在黑猩猩上的发现相近。除了可能与物种有关外，还可能与用于冷冻的精子的来源不同有关。

动物的精子对甘油、二甲亚砜、乙二醇和丙二醇的通透性不同，因而运用渗透性大的防冻剂保存精子能够获得较高的存活率（Gilmore et al，1997）。结合本研究的冷冻结果，我们推测猕猴的精子对甘油和乙二醇的通透性大于二甲亚砜和丙二醇。此外，渗透性防冻剂具有毒性（可以导致精子质膜结构改变，降低精子的运动能力，影响精子的受精功能），而动物的精子对防冻剂的这种毒性的反应又有物种差异（Hammerstedt et al，1990）。我们的结果提示，丙二醇和二甲亚砜冻存的精子复苏运动度急剧下降，一个重要原因可能就是这两种渗透性防冻剂在冷冻复苏过程中对猕猴精子产生了较大的毒性作用；且丙二醇对猕猴精子运动能力的负作用更大，致使冷冻后活动精子的百分率降低至零，细胞膜和顶体结构完整的精子仍然分别占到（28.3 ± 6.5%）和（72.3 ± 3.5%）。除了精子细胞膜受到损伤之外，丙二醇可能还对猕候精子的其他结构和功能造成了严重的损伤。因为除了细胞膜外，精子的尾部结构、头部遗传物质的损伤以及能量代谢的失衡都可以导致活动能力的丧失（Watson，1995）。而渗透性防冻剂的存在则可以直接干扰精子能量代谢的平衡（Hammerstedt et al，1990），因此丙二醇对猕候精子能量代谢的负面影响很可能显著大于另外 3 种防冻剂。但渗透性防冻剂是如何干扰精子能量代谢的，还有待进一步探讨。

参考文献:

Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium [J]. *Biol. Reprod.*, **28**: 235-247.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm [J]. *Gamete Res.*, **15**: 213-226.

Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock [J]. *Rev. Reprod.*, **5**: 46-52.

Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. 1998. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate [J]. *Hum. Reprod.*, **13**: 3384-3389.

Feradis AH, Pawitri D, Suatha IK, Amin MR, Yusuf TL, Sajuthi D, Budiarsa IN, Hayes ES. 2001. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *J. Med. Primatol.*, **30**: 100-106.

Gabriel Sanchez-Partida L, Maginnis G, Dominko T, Martinovich C, McVay B, Fanton J, Schatten G. 2000. Live rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm [J]. *Biol. Reprod.*, **63**: 1092-1097.

Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK. 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa [J]. *Hum. Reprod.*, **12**: 112-118.

Gould KG, Styperek RP. 1989. Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm [J]. *Am. J. Primatol.*, **18**: 275-284.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive [J]. *J. Androl.*, **11**: 73-87.

Mantovani R, Rora A, Falomo ME, Bailoni L, Vincenti L. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: Semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test [J]. *Reprod. Nutr. Dev.*, **3**: 217-226.

Morrell JM, Hodges JK. 1998. Cryopreservation of non-human primate sperm: Priorities for future research [J]. *Anim. Reprod. Sci.*, **53**: 43-63.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature [J]. *Nature*, **164**: 666-668.

Sadleir RMFS. 1966. The preservation of mammalian spermatozoa by freezing [J]. *Lab. Pract.*, **15**: 413-417.

Si W, Zheng P, Tang X, He X, Wang H, Bavister BD, Ji W. 2000. Cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa and their functional assessment by *in vitro* fertilization [J]. *Cryobiology*, **41**: 232-240.

Sztein JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation [J]. *Cryobiology*, **42**: 28-39.

Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. 1996. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen [J]. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**: 485-492.

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function [J]. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**: 871-891.

Yang SC, Ji WZ, Chen JC, Shang EY, Zou RJ. 1994. The use of improved penile electroejaculation in rhesus, tibetan and assamese macaques and study on the parameters of their semen [J]. *Zool. Res.*, **15**: 77-83. [杨上川, 季维智, 陈建春, 商恩缘, 邹如金. 1994. 一种改进的阴茎电刺激采精法和猕猴藏酋猴及熊猴的采精及其精液特征的初步研究. 动物学研究, **15**: 77-83.]